

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-338108

(43)Date of publication of application : 08.12.2000

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/543

---

(21)Application number : 11-148273

(71)Applicant : SEKISUI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 27.05.1999

(72)Inventor : AKAMINE TAKAYUKI  
YOKOI MASAYUKI

---

(54) IMMUNE AGGLUTINATION MEASURING REAGENT AND MANUFACTURE OF THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure an antigen or antibody with high sensitivity by combining the antigen or antibody corresponding to the antibody or antigen of a substance to be measured with a carrier protein in a solution, and enabling the carrier protein to be held by an insoluble carrier.

SOLUTION: An antigen or antibody corresponding to an antibody or antigen as a substance to be measured is combined with a carrier protein. Then the solution including the carrier protein is added to the suspension of an insoluble carrier and stirred, so that the carrier protein is coupled with the insoluble carrier by physical adsorption. On this occasion, pH of the solution is approximately 3-10, and a temperature thereof is approximately 2-50° C. As the carrier protein is coupled with the insoluble carrier after the antigen or antibody corresponding to the antibody or antigen as the substance to be measured is compounded with the carrier protein, the orientation of the corresponding antigen or antibody is improved, and the agglutination is easily available even though its concentration is low. In this way, an immune agglutination measuring reagent capable of detecting a very small amount of antibody or antigen in a biological sample can be obtained.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-338108  
(P2000-338108A)

(43) 公開日 平成12年12月8日 (2000.12.8)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/543	5 8 1	G 0 1 N 33/543	5 8 1 W 5 8 1 U

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平11-148273	(71) 出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22) 出願日	平成11年5月27日 (1999.5.27)	(72) 発明者	赤峰 隆之 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内
		(72) 発明者	横井 正之 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 免疫凝集反応測定試薬及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 試料中の抗原（または抗体）などの超微量成分を高感度で測定でき、B/F分離を必要とせず、簡便に測定し得る免疫凝集反応測定試薬を提供する。

【解決手段】 溶液中において、測定対象物質である抗体（または抗原）に対応した抗原（または抗体）をキャリアータンパク質に複合化させた後、該キャリアータンパク質を不溶性担体に担持させる、免疫凝集反応測定試薬の製造方法。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 溶液中において、測定対象物質である抗体（または抗原）に対応した抗原（または抗体）をキャリアータンパク質に複合化させた後、該キャリアータンパク質を不溶性担体に担持させることを特徴とする免疫凝集反応測定試薬の製造方法。

【請求項2】 溶液中において、測定対象物質である抗体が認識するエピトープの配列が含まれるペプチドをキャリアータンパク質に複合化させた後、該キャリアータンパク質を不溶性担体に担持させることを特徴とする免疫凝集反応測定試薬の製造方法。

【請求項3】 前記ペプチドとして、等電点が、前記キャリアータンパク質の等電点-0.5以下、または等電点+0.5以上の範囲にあるペプチドが用いられ、該ペプチドが複合化されたキャリアータンパク質が不溶性担体に担持される際に、溶液のpHが、前記キャリアータンパク質の等電点-0.5以上、等電点+0.5以下の範囲とされることを特徴とする請求項2に記載の免疫凝集反応測定試薬の製造方法。

【請求項4】 前記測定対象物質が、C型肝炎ウイルス抗体であり、前記ペプチドとして、等電点が1~4.5または5.5~13の範囲にあるものが用いられ、前記キャリアータンパク質としてウシ血清アルブミンが用いられ、前記ペプチドが複合化されたキャリアータンパク質が不溶性担体に担持される際に、溶液のpHが4.5~5.5とされることを特徴とする請求項3に記載の免疫凝集反応測定試薬の製造方法。

【請求項5】 請求項4に記載の免疫凝集反応測定試薬の製造方法により製造される免疫凝集反応測定試薬であって、前記ウシ血清アルブミン1分子に対し、平均で15分子以下の割合で前記ペプチドが複合化されていることを特徴とする免疫凝集反応測定試薬。

【請求項6】 C型肝炎ウイルス抗体が認識するエピトープの配列を有する前記ペプチドが、下記の1~4の配列のうち、少なくとも1つの配列を有することを特徴とする請求項4に記載の方法により製造された免疫凝集反応測定試薬、または、請求項5に記載の免疫凝集反応測定試薬。

配列番号1. Val Ile Pro Asp Arg  
Glu Ala Leu Tyr Gln Glu  
Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys

配列番号2. Ser Arg Gly Asn His  
Val Ser Pro Thr His Tyr  
Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Arg

配列番号3. Val Lys Phe Pro Gly  
Gly Gly Gln Ile Val Gly

2

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly

配列番号4. Pro Pro Ala Leu Pro  
Ile Trp Ala Arg Pro Asp  
Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Asp Pro Asp

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗原や抗体を高感度で測定し得る免疫凝集反応測定試薬およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】臨床検査の分野では、生体試料（血液、尿など）を用いて種々の疾患の診断を行っているが、これらを診断する方法として、種々の測定法が開発され利用されている。これらの測定法の代表的な方法として、酵素反応を利用する生化学測定法や抗原抗体反応を利用する免疫測定法が挙げられる。近年においては、生体試料中の成分を精度よく測定することが望まれ、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫測定法が盛んに用いられている。

【0003】免疫測定法としては、免疫比濁法（TIA法）、ラテックス比濁法（LIA法）、酵素免疫測定法（EIA法）、放射免疫測定法（RIA法）などが挙げられ、目的に応じて使い分けされている。すなわち、生体試料中に含まれている成分の量が比較的多い場合は、TIA法やLIA法が使用されている。TIA法やLIA法では、測定される生体試料中の成分としては、例えば、C反応性タンパク質（CRP）、抗ストレプトリジン-O抗体（ASO）、フィブリン分解産物（FDP）などが挙げられ、生体試料中の濃度として、数ng/mL以上の場合に用いられる。これに対して、生体試料中に含まれる成分の量が微量の場合は、EIA法やRIA法が使用され、測定する生体試料中の成分としては、例えば、αフェトプロテイン（AFP）に代表される癌マーカーやインシュリンに代表されるホルモンなどが挙げられ、生体試料中の濃度として、数ng/mL以下の場合に用いられる。

【0004】更に、近年、生体試料中の微量成分の測定が重要視され、EIA法やRIA法などが益々利用されてきている。しかしながら、TIA法やLIA法では測定に要する時間が短く、操作が簡便で種々の自動分析装置（以下、汎用自動分析装置）へ適用可能であるのに対して、EIA法やRIA法では反応時間が長く、操作法が煩雑で、かつ、使用する酵素や放射性同位元素の種類が多岐にわたる。従って、EIA法やRIA法は、特定の自動分析装置（以下、専用自動分析装置）においてのみ用いられることが多く、RIA法に至っては放射性同位元素を利用するため特定の施設が必要というような種

々の問題がある。

【0005】近年、生体試料中の微量成分の測定においては、癌などの早期発見やエイズウイルスなどの感染初期を診断するため、超微量でも測定できる方法が要望されている。超微量測定が可能な手法としては、LIA法やEIA法の変法または改良法など測定法自体の精度を上げる手法と、LIA法やEIA法などでは従来からの方法で測定に使用する装置の性能を上げる手法に大別され、一部実用化されている。

【0006】測定法自体の精度を上げる手法としては、LIA法の不溶性担体を着色する方法（特開平1-214760号公報）、EIA法の抗原または抗体を標識する物質として酵素の代わりに、発光物質を利用する方法（特開平5-34346号公報）などが挙げられる。また、装置の性能を上げる手法として、特開平3-167475号公報に提案される方法がある。

【0007】しかしながら、これらのいずれの手法においても、汎用自動分析装置への適用は不可能であり、専用自動分析装置が必要という問題は解決されていない。専用自動分析装置が必要な理由は、上述のように、EIA法やRIA法に代表される微量成分の測定法では、反応時間、操作法、使用する酵素や放射性同位元素の種類などが測定法により種々異なることによる。さらに、これら以外の大きな理由として、現在、開発または上市されている微量成分の測定法では、B/F分離と呼ばれる操作（Bは免疫反応等により結合した成分、Fは未反応の成分）が必ず必要であるため、B/F分離操作のできない汎用自動分析装置へは適用できず、B/F分離操作のできる専用自動分析装置が必要となってくる。

【0008】最近、特開平5-249112号公報、特開平7-179495号公報などにみられるように、B/F分離の不必要な測定法も提案、開発されている。しかしながら、感度不足や、測定時間が長いなどの問題により、専用自動分析装置が必要となったり、一部の汎用自動分析装置にしか適用できないなどの問題がある。

【0009】一方、臨床検査の現場においては、超微量分析を行うには高価な専用自動分析装置が必要で、かつ、設置場所を確保しなければならないため、汎用自動分析装置による超微量成分の測定を望む声が大い。

【0010】以上のように、現在、開発または上市されている超微量成分の測定は、ユーザーの強い要望があるにもかかわらず、B/F分離操作が必要なため、専用自動分析装置での測定に限られているという大きな問題点がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上述した従来技術の欠点を解消し、試料中の抗原または抗体などの超微量成分を高感度で測定することができ、B/F分離を必要とせず、簡便に上記超微量成分を測定することを可能とする免疫凝集反応測定試薬およびその製造

方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】本願の第1の発明は、溶液中において、測定対象物質である抗体（または抗原）に対応した抗原（または抗体）をキャリアータンパク質に複合化させた後、該キャリアータンパク質を不溶性担体に担持させることを特徴とする免疫凝集反応測定試薬の製造方法である。

【0013】本願の第2の発明は、溶液中において、測定対象物質である抗体が認識するエпитープの配列が含まれるペプチドをキャリアータンパク質に複合化させた後、該キャリアータンパク質を不溶性担体に担持させることを特徴とする免疫凝集反応測定試薬の製造方法である。

【0014】第2の発明に係る製造方法の特定の局面では、前記ペプチドとして、等電点が、前記キャリアータンパク質の等電点-0.5以下、または等電点+0.5以上の範囲にあるペプチドが用いられ、該ペプチドが複合化されたキャリアータンパク質が不溶性担体に担持される際に、溶液のpHが、前記キャリアータンパク質の等電点-0.5以上、等電点+0.5以下の範囲とされる。

【0015】また、第2の発明に係る免疫凝集反応測定試薬の製造方法のより特定の局面では、前記測定対象物質が、C型肝炎ウィルス抗体であり、前記ペプチドとして、等電点が1~4.5または5.5~13の範囲にあるものが用いられ、前記キャリアータンパク質としてウシ血清アルブミンが用いられ、前記ペプチドが複合化されたキャリアータンパク質が不溶性担体に担持される際に、溶液のpHが4.5~5.5とされる。

【0016】本願の第3の発明は、第2の発明に係る免疫凝集反応測定試薬の製造方法により製造される免疫凝集反応測定試薬であって、前記ウシ血清アルブミン1分子に対し、平均で15分子以下の割合で前記ペプチドが複合化されていることを特徴とする。

【0017】第3の発明に係る免疫凝集反応測定試薬の特定の局面では、C型肝炎ウィルス抗体が認識するエпитープの配列を有する前記ペプチドが、下記の配列のうち、少なくとも1つの配列を有するものが用いられる。

【0018】配列番号1. Val Ile Pro Asp Arg Glu Ala Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys

配列番号2. Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg

配列番号3. Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro A

rg Arg Gly

配列番号4. Pro Pro Ala Leu Pro  
lle Trp Ala Arg Pro Asp  
Tyr Asn Pro Pro Leu Leu G  
lu Ser Trp Lys Asp Pro As  
p

【0019】

【発明の実施の形態】以下、本発明の詳細を説明する。  
本発明に係る免疫凝集反応測定試薬より測定される測定  
対象物質としては、生体試料中の抗原または抗体が挙げ  
られ、例えば、肝炎（B型もしくはC型など）由来抗原  
または抗体、HIV抗原または抗体、梅毒由来抗原また  
は抗体、 $\alpha$ -フェトプロテインに代表される癌マーカ  
ー、インシュリンに代表されるホルモン、オータコイド  
などを例示することができるが、特にこれらに限定され  
るものではない。

【0020】本発明の免疫凝集反応測定試薬では、上記  
測定対象物質である抗体（または抗原）に対応した抗原  
（または抗体）がキャリアータンパク質に複合化され  
る。ここで、キャリアータンパク質に複合化される抗原  
（または抗体）としては、上記測定対象物質である抗体  
（または抗原）と免疫反応により免疫複合体を形成し得  
る限り、特に限定されるものではない。

【0021】測定対象物質が抗原であり、キャリアータ  
ンパク質に抗体を複合化させる場合には、抗体として  
は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のい  
ずれであってもよい。また、抗体の製造方法についても特  
に限定されるものではない。例えば、ポリクローナル抗  
体は、ウサギ、山羊、メン山羊などの動物に測定対象物  
である抗原を免疫して産生させることができる。モノク  
ローナル抗体についても、公知の方法により得ることが  
できる。

【0022】上記のようにして得られた抗体について  
は、クロマトグラフィーなどにより、適宜精製してもよ  
く、場合によっては特別の精製を行うことなく用いても  
よい。また、キャリアータンパク質に抗体を複合化させ  
る場合には、適当な緩衝液などにより抗体を希釈して用  
いてもよい。緩衝液としても、特に限定されず、例え  
ば、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グリシン緩衝液、G  
ood緩衝液などを用いることができ、使用する抗体や  
キャリアータンパク質を考慮し、適宜選択すればよい。

【0023】測定対象物質が抗体であり、抗原がキャリ  
アータンパク質に複合化される場合には、上記抗原とし  
ては、タンパク質あるいはポリペプチドのいずれであ  
ってもよく、製造方法についても特に限定されるものでは  
ない。抗原としてタンパク質を用いる場合には、該タン  
パク質は天然物から得られるものであってもよく、遺伝  
子工学的な手法により得られたものであってもよい。ま  
た、上記抗原としてペプチドを用いる場合においても、  
化学的に合成されたペプチド、遺伝子工学的な手法により

得られたペプチドなどのいずれをも用いることができ、  
通常、化学的に合成されたペプチドが用いられる。

【0024】本発明において用いられる上記キャリアー  
タンパク質としては、抗体（または抗原）を複合化、す  
なわち複合化し得るものであれば特に限定されない。例  
えば、上記キャリアータンパク質としては、ウシ血清ア  
ルブミン（Bovine serum albumi  
n）、キーホールリンペットヘモシアニン（Keyho  
le limpet hemocyanin）、オボア  
ルブミン（Ovalbumin）、ヒト血清アルブミン  
（Human serum albumin）、トロン  
ボグロブリン（Thromboglobulin）、微  
小管結合タンパク質（Microtubule ass  
ociated protein）、ジフテリア毒素  
（Diphtheria toxoid）等を例示する  
ことができる。

【0025】上記キャリアータンパク質は、天然物から  
得られたものであってもよく、遺伝子工学手法により得  
られたものであってもよく、いずれをも用いることがで  
き、通常、天然物から得られたキャリアータンパク質が  
用いられる。

【0026】本発明で用いられる不溶性担体としては、  
例えば、有機高分子粉末、微生物、血球及び細胞膜片な  
どを挙げることができ、特に限定されるものではない。  
有機高分子粉末としては、例えば、不溶性アガロース、  
セルロース、不溶性デキストランなどの天然高分子粉  
末；ポリスチレン、スチレンスルホン酸塩共重合体、  
スチレンメタクリル酸共重合体、アクリロニトリル  
ブタジエンスチレン共重合体、塩化ビニルアクリル  
酸エステル共重合体、酢酸ビニルアクリル酸エステル  
共重合体などの合成高分子粉末を挙げるができる。  
特に、合成高分子粉末を均一に懸濁させたラテックスが  
好適に用いられる。

【0027】上記不溶性担体は、その使用目的・用途に  
よって異なるが、通常、化学合成により得ることがで  
き、あるいは市販されているものを用いることができ  
る。また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基を導入  
した不溶性担体も適宜用いることができる。

【0028】不溶性担体として上記ラテックスを用いる  
場合、ラテックス粒子の粒径は0.005~1.5 $\mu$ m  
が好ましく、0.05~0.6 $\mu$ mがより好ましい。本  
発明において、抗体（または抗原）が複合化されたキャ  
リアータンパク質の不溶性担体への担持方法については  
特に限定されず、吸着、化学結合あるいは包接などの適  
宜の方法で行われる。

【0029】すなわち、不溶性担体にキャリアータンパ  
ク質を担持させる方法については、使用するキャリアー  
タンパク質の種類によって異なるが、通常、以下の方法  
で行われる。

【0030】キャリアータンパク質を含む溶液を不溶性

10

20

30

40

50

担体の懸濁液に添加し、攪拌する。その結果、物理的吸着により、キャリアータンパク質が不溶性担体に結合される。

【0031】また、表面にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されている不溶性担体の場合には、適当な架橋剤を添加することにより、キャリアータンパク質を不溶性担体に化学的に結合させることができる。この場合、架橋剤で架橋できるように、キャリアータンパク質を修飾してもよい。

【0032】上記のように物理的に吸着させる方法あるいは架橋剤により結合する方法のいずれを採用するかは、使用するキャリアータンパク質の物性や構造を考慮して、適宜選択すればよく、両者を併用してもよい。

【0033】上記キャリアータンパク質を不溶性担体に担持させる際の溶液のpHは3~10、温度は2~50℃が好ましい。pHがこの範囲を外れると、キャリアータンパク質または抗原（または抗体）がタンパク質であるため、変性する恐れがある。また、温度については、2℃未満であると反応速度が遅く、所望の感度を有する免疫凝集反応測定試薬を得ることが困難となることがあり、50℃を超えると、キャリアータンパク質または抗原（または抗体）は変性する恐れがある。

【0034】従来の免疫凝集反応測定試薬と測定対象物質が含まれている生体試料とを混合すると、生体試料中の抗原（または抗体）と、不溶性担体に担持された抗体（または抗原）との抗原抗体反応が起こり、不溶性担体の凝集が生じる。もっとも、測定対象物質が微量の場合には、凝集の程度が小さく、検出できないことがある。

【0035】これに対して、本発明では、測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）が、キャリアータンパク質に複合化された後に、該キャリアータンパク質が不溶性担体に担持されている。従って、測定対象物質である抗原（または抗体）に対する抗体（または抗原）の配向性が高められ、生体試料中の抗原（または抗体）の濃度が低い場合であっても、凝集し易くなる。特に、測定対象物質が抗体の場合、その抗体に対する抗原として合成ペプチドを用いることにより、抗原の等電点を自由に調整することができる。上記ペプチドの等電点をキャリアータンパク質の等電点より0.5以上高くしたり、あるいは低くすることにより、キャリアータンパク質の等電点付近のpHの緩衝液中で不溶性担体に担持させる際に、ペプチドが荷電を帯びることになり、それによってさらに配向性が高まり、より一層凝集が起こり易くなる。

【0036】従って、好ましくは、上記ペプチドとして、等電点が、キャリアータンパク質の等電点-0.5よりも低く、あるいはキャリアータンパク質の等電点+0.5よりも高いペプチドが用いられる。なお、ペプチドの等電点の上限は13であるため、好ましいペプチドの等電点の上限値は13である。

【0037】なお、本発明に係る免疫凝集反応測定試薬において、測定対象物質がC型肝炎ウィルス抗体の場合、すなわちC型肝炎ウィルス抗体測定用の免疫凝集反応測定試薬に、キャリアータンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた場合には、ウシ血清アルブミンの等電点が5.0であるため、ペプチドとしては、等電点が4.5以下、または5.5以上のものが好適に用いられ、より好ましくは等電点が1~4.5または5.5~13の範囲にあるペプチドが用いられる。この場合、ウシ血清アルブミンの等電点付近のpHの緩衝液中で、ウシ血清アルブミンを不溶性担体に担持させることにより、ペプチドを荷電を帯びることになり、それによって凝集が起こり易くなる。従って、ウシ血清アルブミンを不溶性担体に担持させる際の緩衝液のpHは、4.5~5.5の範囲とすることが好ましい。

【0038】また、上記ペプチドを例えばウシ血清アルブミンに複合化する場合には、ウシ血清アルブミン1分子に対してペプチドを16分子以上複合化すると、ウシ血清アルブミンが不溶化する。ウシ血清アルブミンが不溶化すると、不溶性担体に担持させることができなくなるため、ウシ血清アルブミン1分子に対し複合化されるペプチドは15分子以下であることが望ましい。

【0039】さらに、C型肝炎ウィルス抗体が認識するエピトープは、各抗原タンパク質にそれぞれ複数箇所存在するが、特に抗原性が高いので、配列番号1~4のアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列が含まれていることが望ましく、それによってC型肝炎ウィルス抗体をより効果的に検出することができる。なお、配列番号1~3の配列が特に抗原性が高いことは、従来より公知である（Journal of Immunoassay, 16(2), 167-181(1995)）。

【0040】なお、配列番号1~4のペプチドの等電点は、以下の通りである。配列番号1のペプチドの等電点=3.4、配列番号2のペプチドの等電点=7.3、配列番号3のペプチドの等電点=10.8、配列番号4のペプチドの等電点=4.0。

【0041】

【実施例】以下、本発明の実施例を説明することにより、本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0042】（実施例1）

#### ①試薬及び材料

a) ラテックス溶液：10%（W/V）ポリスチレンラテックス溶液（ラテックスの粒径0.4μm、積水化学工業社製）

b) ラテックス希釈用緩衝液：50mMの第1リン酸ナトリウムと50mMの第2リン酸ナトリウムとをpH5となるように混合したもの

c) C型肝炎ウィルス抗体：配列番号2のアミノ酸配列を有する合成ペプチドをマレイミド反応によりウシ血清

アルブミンに複合化したもの

d) 抗原希釈用緩衝液: 上記ラテックス希釈用緩衝液と同じものを使用

e) ブロッキング用緩衝液: 50 mMの第1リン酸ナトリウムと50 mMの第2リン酸ナトリウムとをpH=6.5となるように混合したものに、ウシ血清アルブミン(Fraction V, Miles Corp社製)を1% (W/V) となるように、かつNaN<sub>3</sub>を0.1% (W/V) となるように添加したもの

f) 検体希釈用希釈液(R1液): ブロッキング用緩衝液に、ポリエチレングリコール(平均分子量7500、和光純薬社製)を1% (W/V) となるように添加したもの

g) C型肝炎ウイルス検体: C型肝炎ウイルス陽性患者血清(INTERGEN社製)

#### ②ラテックス試薬の調製

上記ポリスチレンラテックス液1容に、ラテックス希釈用緩衝液2容を添加し、3.3% (W/V) ラテックス液を得た。合成ペプチド抗原をタンパク質濃度が800 μg/mlとなるように抗原希釈用緩衝液で希釈し、抗原液を得た。

【0043】上記3.3% (W/V) ラテックス液400 μlを25℃のインキペーター中でマグネチックスターラーを用いて攪拌しつつ、上記抗原液100 μlを素早く添加し、25℃で1時間攪拌した。

【0044】次に、ブロッキング用緩衝液を0.5 ml添加し、25℃で、続けて1時間攪拌した。さらに、この混合液を15℃、18000 rpmで20分間遠心分離した。

【0045】遠心分離により得られた沈殿に、ブロッキング用緩衝液を2 ml添加し、上記と同様にして、再度遠心分離し、沈殿を洗浄した。この洗浄操作は合計3回行った。

【0046】洗浄後に、沈殿にブロッキング用緩衝液2 mlを添加し、よく攪拌した後、超音波粉碎機を用いて分散処理し、固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬を得、4℃で保存した。

#### 【0047】③C型肝炎ウイルス検体の測定

上記ラテックス試薬(合成ペプチド抗原をウシ血清アルブミンに複合化し、かつラテックスに担持させた試薬)からなる免疫凝集反応測定試薬を用い、生化学用自動分析装置(日立製作所社製、品番: 7170型)を用い、以下のようにしてC型肝炎ウイルス検体の測定を行った。すなわち、上記②ラテックス試薬の調製で得られた固形分0.25% (W/V) のラテックス試薬をそのままR2液とし、以下の測定条件で測定を行った。

【0048】

検体容量	20 μl
検体希釈用希釈液(R1液)	180 μl
ラテックス試薬(R2液)	20 μl
測定波長	700 nm
測定温度	37℃

測定に際しては、上記自動分析装置セルに入れられた検体にR1液を投入し、5分後にR2液を投入した。ラテックス試薬すなわちR2液を添加してから約60秒後の吸光度と、約310秒後の吸光度との差を測定し、この吸光度の差を10000倍したものを吸光度変化量とした。

#### 【0049】④測定結果

C型肝炎ウイルス陽性患者血清5検体(それぞれ、検体名称を、検体イ、ロ、ハ、ニ、ホとする)を検体として用い、2段階希釈により2<sup>10</sup>倍まで希釈したサンプルを用意した。上記③の測定方法に従って、各サンプルの吸光度変化を測定し、吸光度変化量=40をカットオフ値とし、吸光度変化量がカットオフ値以上のものについては+、カットオフ値未満のものについては-とした。結果を下記の表1に示す。

【0050】(比較例1) 実施例においては、ポリスチレンラテックスに、C型肝炎ウイルス抗原として、合成ペプチドをウシ血清アルブミンに複合化したものを担持させたが、比較例1では、合成ペプチドのみを用いた。その他の点については、実施例1と同様とした。すなわち、比較例1では、合成ペプチドのみがラテックスに担持されたラテックス試薬を調製した。上記のようにして得られたラテックス試薬を用い、実施例と同様にC型肝炎ウイルス検体の測定を行った。結果を下記の表1に示す。

【0051】(比較例2) C型肝炎ウイルス抗体測定用EIAキットとして、市販のEIAキット(ダイナボット社製、品番: HCV-EIA II)を用い、キット添付の操作法に従って測定を行った。なお検体としては、実施例と同様に、C型肝炎ウイルス陽性患者血清を検体とし、2段階希釈により2<sup>10</sup>倍まで希釈したサンプルを用いた。

【0052】また、キット添付の操作法に従って、各サンプルの吸光度を測定し、キットに付属の陽性コントロール及び陰性コントロールの吸光度から算出したカットオフ値以上のものを+、カットオフ値未満のものを-とした。結果を下記の表1に示す。

【0053】

【表1】

11			12							
			希 釈 倍 率							
			2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>
検 体	イ	実施例1	+	+	+	+	+	+	-	-
		比較例1	+	+	+	-	-	-	-	-
		比較例2	+	+	+	+	+	+	-	-
	ロ	実施例1	+	+	+	+	+	+	-	-
		比較例1	+	+	-	-	-	-	-	-
		比較例2	+	+	+	+	+	+	-	-
	ハ	実施例1	+	+	+	+	-	-	-	-
		比較例1	+	+	-	-	-	-	-	-
		比較例2	+	+	+	+	-	-	-	-
	ニ	実施例1	+	+	+	+	+	-	-	-
		比較例1	+	+	-	-	-	-	-	-
		比較例2	+	+	+	+	+	+	-	-
	ホ	実施例1	+	+	+	+	+	+	-	-
		比較例1	+	+	+	-	-	-	-	-
		比較例2	+	+	+	+	+	+	-	-

表1から明らかなように、従来のラテックス試薬による測定結果（比較例1）と、実施例による測定結果は、低濃度液及び高濃度液において一致しなかった。しかしながら、市販のEIA法による測定結果（比較例2）と、実施例の測定結果が同等であるため、実施例の免疫凝集反応測定試薬を用いれば、従来のラテックス試薬を用いた場合に比べて、試料中に含まれている抗体などの超微量成分を高精度に測定し得ることがわかる。

【0054】

【発明の効果】第1の発明に係る免疫凝集反応測定試薬の製造方法では、溶液中において、測定対象物質である抗体（または抗原）に対応した抗原（または抗体）がキャリアタンパク質に複合化された後に、該キャリアタンパク質が不溶性担体に担持される。従って、測定対象物質である抗体（または抗原）に対する抗体（または抗原）の配向性が高められ、それによって測定対象物質中の抗体（または抗原）の濃度が低い場合であっても、凝集がより確実に生じる。よって、生体試料中に含まれている抗体（または抗原）が微量であっても、微量の抗体（または抗原）を高精度に検出し得る免疫凝集反応測定試薬を提供することができる。

【0055】第2の発明においても、測定対象物質である抗体が認識するエピトープの配列が含まれているペプチドがキャリアタンパク質に複合化された後に、該キャリアタンパク質が不溶性担体に担持されるので、測定対象物質である抗体に対するペプチドの配向性が高められ、凝集反応性が高められる。従って、第1の発明と同様に、生体中に含まれている抗体が微量の場合であっ

ても、高精度に該抗体を検出することを可能とする免疫凝集反応測定試薬を提供することができる。

【0056】また、上記ペプチドとして、キャリアタンパク質の等電点-0.5以下、あるいはキャリアタンパク質の等電点+0.5以上のペプチドを用いた場合には、キャリアタンパク質の等電点付近のpHの緩衝液中において、不溶性担体にキャリアタンパク質を担持させれば、ペプチドが荷電を帯びることになるため、測定対象物質である抗体に対するペプチドの配向性を高めることができ、それによって測定感度を高めることができる。

【0057】また、C型肝炎ウィルス抗体測定用の免疫凝集反応測定試薬を構成する場合に、キャリアタンパク質としてウシ血清アルブミンを用い、ペプチドが複合化されたウシ血清アルブミン1分子に対し、上記ペプチドが平均で15分子以下の割合で複合化されている場合には、ウシ血清アルブミンに対して上記ペプチドを容易に担持させることができる。

【0058】また、C型肝炎ウィルス抗体が認識するエピトープの配列が含まれるペプチドとして、上述した配列番号1～4のアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列が含まれているペプチドを用いた場合には、これらの配列が特に抗原性が高いため、C型肝炎ウィルス抗体をより効果的に検出することができる。

【0059】また、本発明に係る免疫凝集反応測定試薬では、上記のように試料中の抗原または抗体などの超微量成分を感度よく測定することができ、しかもB/F分離を必要としないので、測定の簡便化を図り得る。



